

5

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-342255

(43)Date of publication of application : 12.12.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A01H 1/00

(21)Application number : 11-158024

(71)Applicant : JAPAN TOBACCO INC

(22)Date of filing : 04.06.1999

(72)Inventor : HIEI YOSHIHIRO
KASAOKA KEISUKE
ISHIDA YUJI

(54) IMPROVEMENT IN EFFICIENCY OF GENE TRANSFER TO PLANT CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the efficiency of gene transfer to a plant cell simply carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium* without damaging a tissue, to perform transformation and to better a breed by heat-treating a plant cell or a plant tissue.

SOLUTION: A plant cell or a plant tissue derived from a plant selected from the group consisting of rice plant, maize, lawn grass and tobacco is heat-treated at 33-60° C, preferably 35-55° C, more preferably 37-52° C for 5 seconds to 24 hours, especially preferably at 37-52° C for 5 minutes to 24 hours to improve the efficiency of gene transfer to a plant cell carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium*. Preferably the plant cell or plant tissue is derived from an angiosperm, a monocotyledon or a gramineous plant. Preferably after the plant cell or plant tissue is heat-treated or centrifuged, a gene transfer treatment is performed.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P) (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-342255
(P2000-342255A)
(43)公開日 平成12年12月12日(2000.12.12)

(51)IntCl. C12N 15/09 A01H 1/00	識別記号 FI C12N 15/00 A01H 1/00	分類記号 F1 C12N 15/00 A01H 1/00	特許出願公開番号 特開2000-342255 (P2000-342255A)
---------------------------------------	---------------------------------------	---------------------------------------	--

(21)出願番号 (22)出願日	特許出願番号 特開平11-158024 平成11年6月4日(1999.6.4)	審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全16頁)
(71)出願人 (72)発明者 (73)発明者 (74)代理人	出願人 日本たばこ産業株式会社 東京都港区虎ノ門2丁目2番1号 発明者 張江井 祐弘 静岡県静岡市駿河区700番地 日本たばこ産業株式会社農芸育種研究所内 発明者 笠岡 啓介 静岡県静岡市駿河区700番地 日本たばこ産業株式会社農芸育種研究所内 代理人 100038546 弁理士 谷川 英次郎	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57)【要約】
【課題】従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付与することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供すること。
【解決手段】植物細胞又は植物組織を熱処理することに伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供した。

【特許請求の範囲】
【請求項1】 植物細胞又は植物組織を熱処理することに伴う、アグロバクテリウム属細菌を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。
【請求項2】 植物細胞又は植物組織を熱処理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。
【請求項3】 熱処理が3℃～60℃の温度範囲で行われる請求項1又は2記載の方法。
【請求項4】 熱処理が3℃～5℃の温度範囲で行われる請求項3記載の方法。
【請求項5】 熱処理が3℃～5℃の温度範囲で行われる請求項4記載の方法。
【請求項6】 熱処理が5秒間～24時間の範囲で行われる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。
【請求項7】 37℃～52℃の温度下で1分間～24時間熱処理を行う請求項1又は2記載の方法。
【請求項8】 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物由来である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
【請求項9】 用いる植物細胞又は植物組織が单子葉植物由来である請求項8記載の方法。
【請求項10】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科植物由来である請求項9記載の方法。
【請求項11】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ、トウモロコシ、シバ及びタバコから成る群より選ばれた植物由来である請求項8記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【0001】 【発明の属する技術分野】 本発明は、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法に関する。
【0002】

【従来の技術】 アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が低い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養装置が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、さまざまな植物種で最も有用な形質転換の手段として広く用いられている。
【0003】 このように、アグロバクテリウム法は非常に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物組織に依存して大きく異なるが、概して、形質転換に成功していない植物種があるほか、ごく一部の品種のみ形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織が限定されており大量の材料を取り扱うことができない植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を選抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得るこ

とができる作物の種類は、現状では一部に限られている。したがって、このような問題を解決することができ、改良手法の開発が強く望まれている。
【0004】 アグロバクテリウムを介する形質転換方法自体は、植物種により供試材料や培養に用いる培地の組成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバクテリウムの感染源を接種させ、共存培地の間に形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出するという操作ではほぼ共通している。材料となる植物組織に対しては、通常、必要に応じて滅菌処理を行うが、これ以外に特別な処理を施すことなくアグロバクテリウムの感染が行われる (Rogers et al., 1988(参考文献(36)), Visser 1991(参考文献(40)), McCormick 1991(参考文献(31)), Lin et al., 1991(参考文献(30))). 従って、形質転換系の改良は、アグロバクテリウムの宿主、ベクター構成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの種類、供試組織の種類などを中心に研究が行われてきた。
【0005】 これに対し、アグロバクテリウムを接種する前の植物組織を、遺伝子導入がしやすい生理的狀態に変換するという考え方に着目した研究は、ほとんど行われていない。何らかの簡便な処理により、そのような生理的狀態に変換することができれば、いかに利用面積が高く、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も期待される。これまでの植物組織への前処理に関する研究例としては、パーチクルガン(Bidney et al., 1992(参考文献(6)))および超音波(Frick et al., 1997(参考文献(39)))処理が上げられる。どちらの物理的組織を付与することによってアグロバクテリウムの感染を促進し、感染対象となる植物組織を増加させることを目的としている。しかしながら、これは従来より広く行われているリフティスキ法(Borsch et al., 1985(参考文献(19)))を発展させたものに過ぎず、新規な考え方に基づく処理法ではない。なお、効果の程度や有用性は明らかでなく、一般的な手法として用いられないのが現状である。
【0006】 【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付与することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供することである。
【0007】 【課題を解決するための手段】 本発明者らは、鋭意研究の結果、アグロバクテリウム属細菌を用いた遺伝子導入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物組織を熱処理することにより、遺伝子導入効率を有意に向上させることができることを見出し本発明を完成した。
【0008】 すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組

パーバイナイターベクターのLB4404(pTQ233)を用いた試験においてのみ、形質転換体を用いることにより、これまで全く形質転換体を得ることができなかった品種においても形質転換体を得ることができると推察される。

【0041】

【表1】表1 処理温度と未熟胚胚盤におけるQ5遺伝子の一過性発現 (品種: IR72)

処理温度	供試本 胚数	未熟胚数									
		胚盤組織における Q5 発現陽性割合 (%)									
		0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100			
無処理 (陰性)	20	1	0	12	1	0	0	0			
45°C	20	1	5	12	2	0	0	0			
46°C	20	0	0	3	3	7	6	1			

供試菌株: LB4404(pTQ233), 熱処理時間: 10分, 共存 ※ 【表2】表2 処理温度と未熟胚胚盤におけるQ5遺伝子
培養期間: 4日
【0042】

処理温度	供試本 胚数	未熟胚数									
		胚盤組織における Q5 発現陽性割合 (%)									
		0	0-1	1-10	10-20	20-50	50-80	80-100			
無処理 (陰性)	20	0	2	13	3	2	0	0			
47°C	20	0	1	9	2	7	1	0			
48°C	20	0	0	1	3	9	6	1			
49°C	20	0	1	8	5	6	0	0			
50°C	20	3	4	4	2	6	1	0			
50°C	20	0	0	0	0	0	0	0			

供試菌株: LB4404(pTQ233), 熱処理時間: 10分, 共存 ★ 【表3】表3 未熟胚への熱処理と形質転換カルスの選
培養期間: 3日
【0043】

処理	供試本 胚数	未熟胚数		
		胚盤組織における Q5 発現陽性割合 (%)		
		0	0-1	1-10
無処理 (陰性)	50	8		
46°C 5分	51	15		

供試菌株: LB4404(pTQ211m), 共存培養期間: 5日, Ⅱ
m: ハイグロマイシン
【0044】

処理	供試本 胚数	未熟胚数		
		胚盤組織における Q5 発現陽性割合 (%)		
		0	0-1	1-10
無処理 (陰性)	50	1		
46°C 5分	50	8		

供試菌株: LB4404(pTQ211m), 共存培養期間: 5日, P
m: パロモマイシン
【0045】

処理	供試本 胚数	未熟胚数		
		胚盤組織における Q5 発現陽性割合 (%)		
		0	0-1	1-10
無処理 (陰性)	50	1		
46°C 5分	50	8		

供試菌株: LB4404(pTQ233), 共存培養期間: 5日
【0046】

処理	供試本 胚数	未熟胚数		
		胚盤組織における Q5 発現陽性割合 (%)		
		0	0-1	1-10
無処理 (陰性)	133	32		
46°C 3分	111	41		
46°C 10分	95	38		

供試菌株: LB4404(pTQ233), 共存培養期間: 3日
【0047】実施例2

大きさ約1.2 mmのトウモロコシ未熟胚 (品種A188, 農林 30 取り、実施例1と同様にX-q1ucによりQ5遺伝子の発現を調査した。なお、上記の培地および培養法は、Is hida et al. 1996 (参考文献(20))に記載の方法に従った。pS8131とpTQ233は形質転換能力の高いスーパーバイナリーベクターである。

【0048】46°Cで1 10分間処理した未熟胚にLB4404 (pS8131)を接種したときのQ5遺伝子のトランジェントな発現の結果を表7に示す。無処理の対照を含め試験に供した全ての未熟胚でQ5遺伝子の発現が認められた。しかし、その発現部位は対照に比べ無処理した場合に強

く見られた。特に3分間以上熱処理した場合には、未熟胚の胚盤組織の広い部位でQ5遺伝子の発現を示すものが多く見られた。アグロバクテリウムの菌々の菌体を接種したときのQ5遺伝子のトランジェントな発現の出現を被8に示す。熱処理した未熟胚ではいずれの胚体を接種したときも、全ての未熟胚でQ5遺伝子の発現を示した。これに対し、無処理の未熟胚では、いずれの胚体でも熱処理した場合に比べ弱い発現を示した。特に強弱

原性の遺伝子をもたない通常のバイナリーベクターであるLB4404(pTQ211m)およびLB4404(pS8131)を接種した場合は、ほとんどの未熟胚でQ5遺伝子の発現を全く

し、形質転換細胞の選抜を行った。選抜培地上で増殖し

示さなかった。

【0049】スーパーバイナリーベクターであるLB440 (pSBI31) を接種したA188未熟胚での形質転換結果を表9に示す。熱処理していない対照の未熟胚からは、10.7%の効率で形質転換植物が得られた。これに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚では、形質転換効率は20%で、形質転換植物が得られた。この結果から、スーパーバイナリーベクターを用いた場合、材料の未熟胚を接種前に熱処理することにより、従来の形質転換効率に比べて形質転換効率が向上すること、形質転換効率が向上することが明らかとなった。さらに、今までのトウモロコシにおいては成功例のない通常のバイナリーベクターにおいても熱処理することにより初めて形質転換植物が得られた。これらのことから、従来のアグロバクテリウム法では形質転換できなかったA188胚に

＊外のトウモロコシ品種 (Ishida et al., 1996(参考文献(20))) についても熱処理することにより形質転換植物の得られる可能性が示唆された。

【0051】

【表7】表7 熱処理時間の遺伝子導入効率に及ぼす影響 (LB440(pSBI31)を接種)

46℃処理時間 (min)	GUS			
	供試	+++	++	+
0	未熟胚	0	1	18
1	未熟胚	0	2	18
3	未熟胚	2	5	13
5	未熟胚	1	5	14
10	未熟胚	5	3	12

【0055】表例3

クリーピンググランドグラス (*Agrostis palustris* cv. *P* encross, 雪印種苗 (株)) の完熟種子を滅菌後、MS無塩、MSビタミン、4 mg/l dicamba, 0.5 mg/l 6BA, 0.7 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l MES, 20 mg/l ショ糖、3 mg/l zeolite (pH5.8) を含む培地 (TC2培地) に懸床し、25℃、暗黒下で培養した。篩過されたカルスを同組成の培地で継代培養し、エンブリオジェニックなカルスを増殖した。継代後、2 3週間目的カルス約0.3gをTC2培地した。新たに液体培地 (m) を加えた。46℃のウェータ

共存培養後の未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果

【0052】

【表8】表8 熱処理の遺伝子導入効率に及ぼす影響

接種菌株	処理	GUS			
		+++	++	+	-
LB4404 (p1211m)	46℃ 5 min	12	3	0	0
LB4404 (p1211m)	無処理	12	0	1	2
LB4404 (p1211m)	46℃ 5 min	14	2	3	0
LB4404 (p1211m)	無処理	13	0	3	1
LB4404 (p1211m)	46℃ 5 min	15	9	6	0
LB4404 (p1211m)	無処理	16	0	6	10
LB4404 (p1211m)	46℃ 5 min	15	0	2	13
LB4404 (p1211m)	無処理	15	0	0	2

共存培養後の未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果 ※ 【表9】表9 熱処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LB4404(pSBI31)を導入)

処理	供試	PPT 耐性	カルス (%)	GUS 植物 (%)
46℃ 3 min	30	18 (60.0)	15 (50.0)	5 (16.7)
無処理	20	9 (30.0)	9 (30.0)	3 (10.7)

カルス数、植物数はいずれもクロロームを含めない。 【0054】

【表10】表10 熱処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LB4404(pSBI31)を導入)

処理	供試	トランジェント	PPT 耐性	PPT 耐性	GUS 植物 (%)
46℃ 5 min	84	71.4	7 (8.3)	2 (2.4)	2 (2.4)
無処理	20	0	0	0	0

カルス数、植物数はいずれもクロロームを含めない。トランジェントな発現は、共存培養後のカルスを採取して調査した。

【0055】表例3

クリーピンググランドグラス (*Agrostis palustris* cv. *P* encross, 雪印種苗 (株)) の完熟種子を滅菌後、MS無塩、MSビタミン、4 mg/l dicamba, 0.5 mg/l 6BA, 0.7 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l MES, 20 mg/l ショ糖、3 mg/l zeolite (pH5.8) を含む培地 (TC2培地) に懸床し、25℃、暗黒下で培養した。篩過されたカルスを同組成の培地で継代培養し、エンブリオジェニックなカルスを増殖した。継代後、2 3週間目的カルス約0.3gをTC2培地した。新たに液体培地 (m) を加えた。46℃のウェータ

処理	供試	PPT 耐性	カルス (%)	GUS 植物 (%)
46℃ 5 min	84	71.4	7 (8.3)	2 (2.4)
無処理	20	0	0	0

【0059】表例4

(1) 供試組織および供試菌株

タバコ品種ブライトイロー2号の胚嚢培養細胞株B2Dを含む胚嚢培養地で25℃暗条件下で培養し、1週間後、胚嚢培養細胞は0.2mg/l 2,4-Dを含む培地 (m) を加えた。46℃のウェータ

【0060】(2) 無処理

【0061】(3) 接種および共存培養

胚嚢培養細胞へのアグロバクテリウムの接種および共存培養は、Kumar (1989) (参考文献(23))の方法により実施した。25℃暗黒下で2日間共存培養した後、胚嚢培養細胞を、Iliet et al. (1994) (参考文献(13))の方法により実施例1と同様にしてX-gluc処理によるGUS遺伝子の発現調査に供した。

【0062】(4) 結果

胚嚢培養細胞を熱処理し、LB4404(p1211m)との共存培養を行い、GUS遺伝子の一過性発現を調査した結果を表12に示した。無処理区に比べ熱処理をした場合に、GUS発現を示す細胞の頻度は明らかに高く、より高頻度で遺伝子導入が生じたものと解釈された。熱処理は、イネ、トウモロコシおよびシバなどの種子胚植物だけではなく、双子葉植物への遺伝子導入にも効率を向上させる効果があることが確認された。

【0063】

【表12】表12 処理温度と胚嚢培養細胞2におけ

図1 遺伝子の一過性発現

処理温度	処理時間	OD550を示した細胞の増殖率*
無処理 (対照)	-	+
40°C	10分	++
40°C	20分	+++
40°C	10分	+++

* + : 低い, ++ : やや高い, +++ : 高い

供試菌株 : LB4404 (pTOC233), 共培養期間 : 2日

【0064】

【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付着することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる。植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。また、シバのように、従来のアグロバクテリウム法では形質転換することができなかった植物も、本発明の方法により形質転換が可能になった。

【0065】参考文献

- (1) Aldamita RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
- (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In Galvin, S.B. and Schillpero, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual* 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
- (3) Asano, Y., Ueki, M. (1994) Transgenic plants of *Azorella alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246.
- (4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sujiura, K., Fujie, A. (1998) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 17:93-97.
- (5) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12, 8711-8721.
- (6) Bishay, D., Scelone, C., Martich, J., Burnus, M., Sims, L., and Lurie, G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Mol. Biol.* 18, 301-313
- (7) Chan, M.-T., Cheng, H.-H., Ho, S.-L., Tong, W.-F., and Yu, S.-M. (1993) Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene.

technology, 2, 702-709.

- (19) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, N. L., Eichelholz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.
- (20) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. (1995) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nature Biotechnology*, 14, 745-750.
- (21) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology*, 5, 387-405.
- (22) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of Agrobacterium tumefaciens A281. *J. Bacteriol.*, 159, 4417-4425.
- (23) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by Agrobacterium. *Plant Sci.*, 60, 223-229.
- (24) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of a double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 167-171.

- (25) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Oenothera lutea* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTi80542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.
- (26) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (1989) Physical and functional map of supervirulent Agrobacterium tumefaciens tumor-inducing plasmid pTi80542. *J. Bacteriol.*, 166, 88-94.
- (27) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNA for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.*, 10, 165-174.

- (28) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In Vasil, I.K. (ed.) *Molecular Improvement of Cereals*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.
- (29) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, T. and Poon, H.-K. (1996) Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*, 14, 736-740.

- (30) Lindsey, K., Galliois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarcane by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 50

- a) 87:1-13. Kluwer Academic Publishers.
- (31) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 16:1-9. Kluwer Academic Publishers.
- (32) Mirashlo, T. and Skoog, F. (1992) *Physiol.* 15:473-497.
- (33) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakamura, K., (1990) Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31:805-813.

- (34) Potrykus, J., Hams, C. T. and Loriz, H. (1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 54:209-214.
- (35) Potrykus, J., Bilang, R., Fütterer, J., Sautter, C. and Schrott, M. (1998) *Agricultural Biotechnology*, Marcel Dekker Inc. pp. 119-159.
- (36) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transgenic plants using Ti plasmid vectors. *Method for Plant Molecular Biology*, CA: Academic Press Inc. pp. 423-436.

- (37) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takamami, Y. (1992) Chimeric virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.
- (38) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) *Plant Science*, 41:179-183.
- (39) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: a cation-assisted Agrobacterium-mediated transformation. *Transgenic Research* 6:329-336.
- (40) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 15:1-9. Kluwer Academic Publishers.

- (41) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Ohtani, M.-D. and Master, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. *J. Bacteriol.* 123, 255-264.
- (42) Xiao, L., Ha, S.-B. (1997) Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformants following particle bombardment. *Plant Cell Reports* 16:874-878.
- (43) Zambryski, P., Joss, H., Genetello, C., Leonardi, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.*, 2, 2143-2150.

